

Study of *in Vivo* Serum Lipid Regulation with *Ulmus macrocarpa* Hance Extract in Rats

Mi Sun Hwang¹, Tae Hee Kim², Jeong Jun Lee², JungKee Kwon³ and Jin Young Lee^{4*}

¹Department of Pharmaceutical Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

²Naturetech Co., Ltd., Chungcheongnam-do 31257, Korea

³Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonbuk 54896, Korea

⁴Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

Received April 22, 2020 / Revised May 8, 2020 / Accepted May 13, 2020

A previous study reported that *Ulmus macrocarpa* Hance water extract (UME) can improve hyperlipid metabolism and the involvement of suppressed lipid synthesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway regulation was suggested. Further exploration of the lipid metabolism between liver and peripheral tissue was necessary to confirm that work, and so this study aimed to extend the possibility that UME can regulate serum lipids. After a 6-week *in vivo* trial of oral administration of UME to rats with induced hyperlipidemia, serum levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were seen to decrease while HDL cholesterol increased. The UME administrations also decreased the TC and TG levels from the control in liver analysis. However, the suggestion that UME regulates the AMPK pathway to improve hyperlipid states through the suppression of hepatic lipogenesis seems to be only one part of the extract's effect. Indeed, serum concentrations of apolipoproteins A and B were returned to baseline levels of the control group in response to UME administration whilst the liver lipid content was much reduced; this cannot occur through the suggested suppression of hepatic lipogenesis alone. Therefore, a possible mechanism of UME could be that it improves blood circulation by modulating serum lipid levels through both the prior stimulation of lipid oxidation and the suppression of hepatic lipogenesis.

Key words : Apolipoprotein A, Apolipoprotein B, hyperlipidemia, lipid metabolism, *Ulmus macrocarpa* Hance

서 론

왕느릅나무(*Ulmus macrocarpa* Hance)는 느릅나무과 관엽교목으로서 동양에서는 이노제나 소화기계통의 궤양 치료를 위한 한약재로 사용되어 왔으며[9], 그 외 알려진 효능으로 항암, 항염, 항알러지, 항산화, 항균 등 주로 항염증이나 면역 계통의 연구 결과가 보고되어 있다[10, 13, 17]. 본 연구는 왕느릅나무 추출물의 면역개선 효과 확인을 위한 인체적용시험 과정에서 혈중지질수준의 개선 가능성이 제기되었고 이와 연계하여 혈행개선 효과 탐색을 하고자 하였다. 최근 본 연구팀에서 왕느릅나무 열수추출물이 고콜레스테롤 식이로 유발한 고지질혈증 설치류에서 혈중 지질 수준의 개선효과가 있음을 확인하였고, 이것이 adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)의 활성화와 함께 acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1),

sterol response element binding protein-1 (SREBP1), HMG-CoA reductase (HMGCR) 등 지질대사 관련 하위 기전 내 단백질들의 발현 조절에 의한 것임을 보고하였다[8]. 또한, 인간 간암 세포(HepG2)에서의 중성지질과 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현 변화를 조사한 결과 왕느릅나무 추출물이 지질대사 관련 유전자의 발현 조절과 중성지질 합성관련 효소의 활성도 억제를 통해 지방축적을 억제하는 효과를 가지는 것으로 본 연구팀에서 확인하였다[11]. 하지만, 왕느릅나무 추출물에 의한 혈중지질수준 개선 효과로서 기 보고된 간에서의 지질 합성 억제 외에도 이와 연계된 생물학적 변화 가능성에 대한 추가적인 조사가 필요하여 본 연구를 수행하게 되었다. 고콜레스테롤의 섭취는 비정상적 상태의 지질대사로 인해 나타나는 고지질혈증을 일으키는 것으로 알려져 있는데[3] 일반적으로 혈청 내 저밀도지단백-콜레스테롤(Low density lipoprotein - cholesterol, LDL-C), 총콜레스테롤(Total Cholesterol, TC), 중성지질(Triacylglycerol, TG)의 증가와 함께 고밀도지단백-콜레스테롤(High density lipoprotein - cholesterol, HDL-C)의 감소를 동반하는 것으로 알려져 있으며[3, 22], 심근경색이나 뇌졸중 같은 심혈관계 질환을 일으킬 수도 있는 것으로 보고되고 있다[16, 21]. 고지질혈증과 연계하여 혈중 지질수준의 조절에 중요한 역할을 하는 것 중 하나가 아포지단백이며

*Corresponding author

Tel : +82-51-663-5962, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : 0203ruby@hanmail.net, ruby0203@ks.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

각각의 역할 또는 기능에 따라 여러 종류가 있는데 특히 간에서 생성 또는 저장되어 있던 TG, 콜레스테롤 등의 지질을 혈액을 통해 말초조직으로 보낼 때 초저밀도지단백(Very Low Density Lipoprotein, VLDL)형태로 운송되고 이것의 주요 구성 단백질이 아포지단백 B (apolipoprotein B, apoB)이다. 이러한 이유로, apoB는 고지질혈증과 연계된 질환에 대한 진단에 매우 중요한 생체지표로 알려져 있으며 혈청 내 apoB의 증가는 간을 기원으로 하는 지질의 배출 증가를 의미한다[15]. 이와 연계하여 아포지단백 A1 (apolipoprotein A1, apoA1)은 고밀도지단백(HDL)을 구성하는 주요 단백질로서 이를 통해 말초조직, 지방세포, 혈관 등에 존재하는 콜레스테롤을 포함한 지질을 담즙 등을 통해 체외로 배출하기 위해 간으로 운송하거나 호르몬생성을 위해 부신, 난소, 정소 등 스테로이드생성기관으로 운송하는 역할을 하기 때문에 HDL-C의 증가는 혈중 지질 수준 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다[4]. 따라서, 혈중지질수준 변화와 연계하여 이들 아포지단백의 수준 변화는 체내 지질 대사의 현주소를 알 수 있는 주요한 지표로서의 의미를 가진다. AMPK는 지방대사에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고[18] 실제로 고지방식으로 유도된 비만 설치류 모델에서 혈중지질 감소와 간 내 지방축적 저하효과에 주된 역할을 한다고 보고되어 있다[7, 19]. 혈중지질 수준의 개선에 있어서 AMPK의 활성화가 연계된 간 내 주요 지질 대사 기전은 SREBP1의 활성화 감소를 통한 TG 합성감소, ACC1 활성화를 통한 지방산화의 촉진, SREBP2와 HMGCR 활성화 감소를 통한 콜레스테롤합성의 감소가 있다[2, 7, 19]. 본 연구진의 앞선 보고들[8, 11]에서도 왕느릅나무 추출물이 AMPK 활성을 증가시킴으로써 *in vitro*와 유전자 분석 결과를 바탕으로 간에서의 지질합성 및 지방축적을 억제하고 그 결과로 혈중지질 수준의 감소가 일어난 것이라 제안하였지만 아포지단백과 혈중지질수준 변화의 연계성을 확인하여 조금 더 명확한 효과 확인이 요구되었다. 특히, SREBP2의 지질대사조절 기능과 연계하여 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 단백질은 지방대사에 중요한 역할을 가지고 있는데 간 조직에 주로 존재하는 PPAR- α 는 포도당신생작용과 지방산 β 산화를 촉진시키고, 지방조직에 주로 존재하는 PPAR- γ 는 지방조직의 분화를 촉진시키는 역할을 하여 지방세포 내 지방축적을 증가시키고, PPAR- β/δ 는 각 조직에서의 지방산 β 산화를 촉진시키는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[12, 20]. 따라서, 본 연구를 통해 왕느릅나무 추출물이 보여준 혈중지질 개선 효과와 연계하여 간에서의 지질대사조절의 상관성을 사전연구에서 이미 언급한 지방축적 저해효과뿐만 아니라 지질산화의 조절 여부도 포함하여 조사해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 왕느릅나무 열수 추출물은 (주)네이처텍(진천군, 충북, 대한민국)에서 공급받았으며 추출물은 건조 왕느릅나무 껍질에 10% (w/v)의 증류수를 가하여 95°C에서 6시간 추출하고, 50°C에서 2시간 동안 0.4% viscozyme (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)을 처리한 다음 100°C에서 10분간 실활 처리한다. 그리고 여과 및 농축하여 16 brix 상태에서 동결건조 과정을 거쳐 분말 처리된 것을 사용하였다. 이렇게 제조된 시료를 *Ulmus macrocarpa Hance Extract* (UME)라고 명명하였다. 고지질혈증 유도를 위해 실험동물에 공급한 고지방 사료(#D12336, atherogenic rodent diet, 45% kcal fat)는 research diet Inc.사(NJ, USA)에서 표준사료(#D12337, low fat, control for atherogenic diet, 25% kcal fat)와 함께 구입하여 사용하였다. TG는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI)에서, TC, HDL-C, LDL-C 분석을 위한 키트는 Abcam사(Cambridge, MA, UK)에서 구매하여 사용하였다. Western blot 분석을 위한 SREBP-2, PPAR- α , PPAR- γ , β -actin 등에 대한 항체는 Cell Signaling사(Denvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 시료 처리

5주령의 웅성 Sprague Dawley rat (200±50 g body weight)을 ㈜다물사이언스(대전, 한국)에서 분양 받아 동물 사육실 내 실험동물용 케이지에서 개별로 1주일의 적응기간을 거친 후 6주간의 식이 실험에 투입하였다. 동물사육실은 무균실로서 실내온도 22±1°C, 습도 55±5%를 자동 유지하고 12시간 단위로 점등점멸이 되는 환경으로 조성되었다. 실험군은 표준사료만 섭취시킨 음성대조군(non-treated control, N), 고콜레스테롤 사료만 제공한 대조군(high fat diet, HFD), 고콜레스테롤 사료와 왕느릅나무 추출물을 각각 25, 50, 100 mg/kg 수준으로 처리한 시험군(UME25, UME50, UME100)등 총 5개 그룹으로 구성하고 실험군당 10개체씩 배치하였다. 매일 사료섭취량을 기록하였으며 체중 변화는 UME 처리 후부터 주 단위로 측정하였다. 실험 종료 15시간 전에는 사료의 공급을 중단하여 이 후 혈당 측정에 영향을 미치지 않도록 하였다. 실험종료 시점에서 복대정맥에서 혈액시료를 채취하고 혈청을 분리하여 이 후 생체지표 측정에 사용하였다. 또한, 조직분석과 면역화학적 분석을 위해 간 등 조직을 적출하여 -80°C에 보관하였다. 모든 동물들은 CBNU-IACUC (Chonbuk National University, Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(CBNU-2018-068)을 받아 사용지침에 따라 관리하였다.

혈액 및 간 내 지질 수준 변화 측정

TG는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI)에서 제공한 분석법에 따라 혈청 또는 간(추출시료)을 사용하여 측정하였다. TC, HDL-C, LDL-C은 Abcam사(Cambridge, MA, UK)에서 제공한 분석법에 따라 혈청 또는 간(추출시료)을 사용하여 측

정하였다. 혈중 지질 수준 측정을 위해 복대정맥에서 채혈 직후 상용 혈청분리튜브(Vacurette® Tube, Greiner Bio-One GmbH, Austria)를 이용하여 원심분리 후 -80°C에 보관한 혈청을 사용하였다. 간 내 지질 측정을 위해 Folch [5]법을 부분 변경하여 지질을 추출 한 후 상기 측정방법에 따라 분석하였다.

지질대사 관련 단백질의 수준 변화 측정

혈청 내 apoA1과 apoB의 측정은 Novus Biologicals사 (apoA1, Littleton, CO, USA)와 cloud-clone corp.사(apoB, Houston, TX, USA)의 ELISA 키트를 각각 구입하여 제조사에서 제공한 분석방법에 따라 측정하였다.

AMPK 기전 연계 단백질의 변화 측정

AMPK 기전과 연계된 간 조직 내 SREBP-2, PPAR-α, PPAR-γ 등의 단백질은 western blot 방법으로 측정하였다. 분석을 위한 간조직 추출물은 lysis buffer (140 mM NaCl, 25 mM pH7.4 Tris-HCl, 1% NP-40, protease inhibitor cocktail)를 이용하였다. 단백질 분리를 위해 10-15% SDS gel을 이용하여 전기영동을 실시하였고, 전기영동 후 PVDF membrane (BioRad, Hercules, CA)으로 이동 후 각각의 1, 2차 항체들과의 결합과정을 거친 후 Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo, Ca, USA)를 이용하여 면역활성 밴드를 확인하였다. 각 단백질에 대한 정량적 확인은 Chemi Image Analyzing System (Alpha Innotech, CA, USA)를 사용한 밀도 분석을 통해 도출하였다.

통계 처리

시료 분석을 통해 측정된 각각의 결과는 평균±표준편차로 표현하였고, 각 시험군 간의 통계적 유의성 검증은 분산이 동일한 표본이란 가정 하에서 양측 검증을 하는 방법으로 Student t-test를 실시하여 p<0.05일 때 통계적인 차이가 있는 것으로 정의하였으며, Microsoft Excel (Microsoft Professional Plus 2010, ver. 14.0.4760.11000)을 사용하였다.

결과 및 고찰

왕느릅나무 추출물에 의한 혈액과 간조직의 지질 수준 변화
 UME 식이시험 기간 동안 이상 징후가 확인되는 개체는

발견되지 않았으며, 모든 실험은 정상적으로 진행되었다. 표준사료섭취(N)군과 비교했을 때 6주간의 고콜레스테롤 함유 사료 섭취(HFD) 군에서 혈청 TC는 약 68%, TG는 약 70%의 수준 증가를 보였고, 간 조직에서의 TC는 약 134%, TG는 약 62% 증가되어 비슷한 주령의 설치류(mice)에서 동일사료를 2주간 제공하여 확인한 Yang 등[23]의 보고와 마찬가지로 고콜레스테롤 사료섭취에 의해 혈액과 간에서의 지질 수준 증가가 일어났음을 확인하였다. 식이시험 기간동안 체중증가율은 평균 5.47±0.31 g/day로 군간의 차이가 없었으며, 각 군간의 1일 사료 섭취량 역시 18.45±0.10 g/day로 통계적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. 또한, 각 사료의 중량 당 열량(표준사료는 3.9 kcal/g, 고콜레스테롤 사료는 4.7 kcal/g)을 고려했을 때에도 사료를 통한 1일 평균 총섭취열량이 약 83.39±0.75 kcal/day로 이것 역시 시험군간의 유의한 차이는 나타나지 않았다(테이터 표시안함). 다시말해, N군에서는 1일 총섭취열량의 25%인 20.85 kcal를 지방에서 공급받았고, 고콜레스테롤 사료 섭취군에서는 그것의 45%인 37.53 kcal를 지방에서 공급 받은 것이어서 실제적으로 16.68 kcal/day의 열량이 지방으로부터 제공됨에 따라 HFD 군에서의 혈청과 간에 지질 함량이 상기에 언급된 것과 같이 증가된 결과를 나타낸 것이라 사료된다. 이에 대하여, UME 시험군에서는 HFD 군과 비교했을 때 각각 25, 50, 100 mg/kg 처리군에서 혈청 TC가 8%, 15%, 17%씩 감소하였고, 혈청 TG는 각 11%, 16%, 26% 감소됨을 확인하였다(Table 1). 간조직 내 지질 함량 역시 HFD 군과 비교했을 때 각각의 UME 25, 50, 100 mg/kg 처리군에서 콜레스테롤이 4%, 16%, 19%씩 감소하였고, 혈청 TG는 각 3%, 11%, 14% 감소되었다. 이와 연계하여, 고지방식은 정상 수준으로부터 증가된 혈청과 간에서의 TG와 콜레스테롤의 수준이 UME 처리에 의해 감소되는 수준을 보았을 때, 혈청에서의 TG는 70% 증가분이 26%로 줄어 실질적인 감소율은 약 37%였고, 콜레스테롤은 67% 증가분이 39%로 줄어 실질적인 감소율은 약 58%나 됨을 알 수 있었다(Table 1). 간에서의 TG는 HFD 군에서 62%만큼 증가된 것이 UME 처리에 의해 39% 수준으로 실질적인 감소율은 약 63%였고, 콜레스테롤은 134% 증가분이 90% 수준으로 약 67% 감소되었음을 알 수 있다. 이에 따라, UME 처리에 따른 지질 수준의 감소는 혈액 내 감소 비율 보다는 간 내 감소 비율이 더 높은 것으로 보여지며 TG의 감소폭 보다는 콜레스테롤의 감소폭이 더 높은 것으로 사료된

Table 1. TC and TG changes in HFD fed rats with UME

Group	Total cholesterol		Triacylglycerol	
	Serum (mg/dl)	Liver (mg/dl)	Serum (mg/dl)	Liver (mg/dl)
N	110.36 ± 26.10	97.62 ± 25.15	74.44 ± 13.54	152.68 ± 19.27
HFD	184.82 ± 16.47	228.75 ± 19.70	126.26 ± 16.48	246.84 ± 31.17
UME25	170.15 ± 9.29	218.78 ± 13.93	112.85 ± 10.26	239.00 ± 14.92
UME50	156.25 ± 12.13	191.66 ± 17.97	106.60 ± 12.00	219.57 ± 15.20
UME100	153.43 ± 11.87	185.93 ± 13.13	93.73 ± 9.05	212.11 ± 16.07

다(Table 1). 따라서, 간에서의 지질 수준 감소는 지질축적의 감소와 VLDL 등을 통한 지질의 방출 증가에 의한 가능성이 있으며 혈중에서의 지질 수준 감소는 HDL 등을 통한 지질(특히 중성지질)의 체외 배출과 말초조직에서의 지질 이용을 증가에 의한 가능성을 고려할 수 있는데[15] 본 연구결과의 경우 혈청에서의 콜레스테롤 수준 개선이 더 잘되는 것과 간 등 조직에서의 지질수준 복원성이 크다는 점에서 조직에서의 지질 이용률 증가에 더 큰 비중으로 작동되었을 것이라 사료된다.

왕느릅나무 추출물에 의한 혈중 지질 수송 체계의 변화

왕느릅나무 추출물에 의한 혈중지질 수준 감소와 연계하여 HDL-C와 LDL-C의 수준 변화가 N 군에서 각각 50.90±6.88 mg/dl와 44.58±9.15 mg/dl일 때 HFD 군에서 HDL-C는 29.80±5.41 mg/dl로 감소하고 LDL-C는 145.88±12.57 mg/dl로 증가하였다. 이것이 UME 100 mg/kg 처리에 의해 HDL-C는 44.51±6.25 mg/dl로 증가되었고, LDL-C는 113.57±19.91 mg/dl로 감소되었음을 본 연구팀에서 보고한 바 있다[8]. Friedewald 등[6]의 계산법(LDL=TC-HDL-VLDL)을 활용하여 VLDL-C 추정치를 구했을 때, N 군에서 14.89±2.71 mg/dl 였던 것이 HFD 군에서 25.25±3.30 mg/dl로 N 군의 수준에서 70% 증가되었고, 이것이 UME 100 mg/kg을 처리함에 따라 18.75±1.81 mg/dl로 N 군보다 26% 정도 높은 수준으로까지 VLDL의 유입이 감소되었을 것이라 보여진다(Table 2). 이에 대하여 VLDL-C의 주요 구성 단백질인 apoB의 혈액 내 수준 변화를 비교해 본 결과 N 군에서 81.77±13.45 mg/l 수준이던 것이 HFD 군에서 127.66±15.15 mg/l로 약 60% 상승하였고, UME25, UME50, UME100 군은 각각 119.24±21.54 mg/l, 110.44±13.99 mg/l, 82.45±22.96 mg/l로 N 군과 비교 시 46%, 35%, 1% 상승된 수준으로 나타났다(Fig. 1B). 특히, UME100 군에서의 apoB 수준이 N 군의 수준까지 낮아진 것을 볼 때, 간에서 생성된 VLDL의 혈중 배출이 줄었거나, 말초조직에서의 LDL 사용이 증가했거나, 장에서 생성되는 chylomicron의 양이 줄어든 것이 원인이 될 수 있다. ApoB의 경우 간에서 생성되는 VLDL의 주요 구성단백질인 apoB100과 장에서 흡수되는 지질 수송을 위해 생성되는 chylomicron의 주요 구성단백질인 apoB48로 나누어지는데[13] 본 연구에서는 총 apoB를 측정만 하였기에 이들간의 명확한 관계를 특정 짓지는 못하였다. 하지만, VLDL과 chylomicron의 주요 수송 지질이 중성지방이라는 점[15]을 감안 했을 때, 상기에 언급한 UME100에

의한 혈중 TG 감소가 N 군에 비해 약 26% 증가된 수준까지 (i.e. N: 74.44±13.54, UME100: 93.73±9.05) 나타났다. 이것은 표준사료에 비해 고지방사료를 통해 약 20%에 해당하는 열량을 추가된 지질로부터 공급받았기 때문에 UME100 군에서 고지방사료 섭취를 통한 장에서 흡수된 TG의 수준 증가는 필연적임을 의미한다. 다시 말해, UME에 의해 감소되는 apoB는 chylomicron을 구성하는 apoB48 이라기 보다는 간에서 생성된 VLDL을 구성하는 apoB100이 주종이라는 것을 시사하고 있다. 때문에, UME는 VLDL을 통한 혈중으로의 지질 배출 저하 또는 말초조직에서의 VLDL (LDL) 사용을 촉진시키는 효과를 주로 가지는 것으로 사료된다. 또한, 앞서 언급된 UME에 의한 간에서의 TG 함량의 감소 정도가 혈액에서의 TG 수준의 감소에 비해 여전히 높은 것은 간으로부터 생성/배출되는 VLDL의 감소에 의한 것으로, 혈중지질 수준에서의 감소라기 보다 말초조직에서의 VLDL (LDL)의 사용이 더 촉진되었음을 알 수 있다. 이에 대한 또 다른 근거로서, 조직에서 지질의 산화과정 이후 체외 배출을 위한 지질운송체인 HDL의 주요 구성단백질인 apoA1 [24]의 수준변화를 언급할 수 있다. N 군에서의 apoA1의 수준이 84.40±21.03 mg/l이었을 때 HFD 군에서 48.20±6.59 mg/l로 N 군 대비 약 43% 수준으로 감소하였고, UME25, UME50, UME100 군에서 63.85±10.74 mg/l, 67.07±11.23 mg/l, 74.77±14.02 mg/l로 N 군의 76%, 79%, 89% 수준으로 apoA1이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 이는 상기 언급된 HDL-C의 수준 변화와 거의 일치하는데 HFD 군에서 HDL-C이 N 군 대비 약 41% 수준으로 감소했을 때, UME25, UME50, UME100군에서 N 군의 75%, 80%, 87% 수준으로 증가된 결과와 같은 경향성을 나타내었다(Table 2). 따라서, UME에 의한 혈중지질 수준의 감소는 HDL-C 수준 상승을 유도할 만큼의 말초조직에서의 VLDL (LDL)의 이용 촉진작용이 있었음을 시사하고 있다.

왕느릅나무 추출물에 영향을 받는 체내 지질 대사 조절 기전

본 연구팀의 다른 보고들[8, 11]에서 언급했던 UME가 가지는 AMPK 조절에 의한 간에서의 지질 축적 저해효과와 본 연구에서 확인한 말초조직에서의 지질사용 촉진 효과를 혈중 지질 수준의 개선효과와 직접적으로 연관 짓기 위해서는 추가적으로 말초조직에서 지질이 어떻게 사용되었는지 이것이 지질축적 저해와 어떤 연관성을 가졌는지에 대한 확인이 필요하여 AMPK 조절 후의 지질대사와 연계된 조절 단백질들의 변

Table 2. HDL-C, LDL-C and VLDL-C changes in HFD fed rats with UME

Group	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)
N	50.90±6.88	44.58±9.15	14.89±2.71
HFD	29.80±5.41	145.88±12.57	25.25±3.30
UME25	38.39±5.13	119.00±13.32	22.57±2.05
UME50	40.91±8.51	115.57±16.87	21.32±2.40
UME100	44.51±6.25	113.57±19.91	18.75±1.81

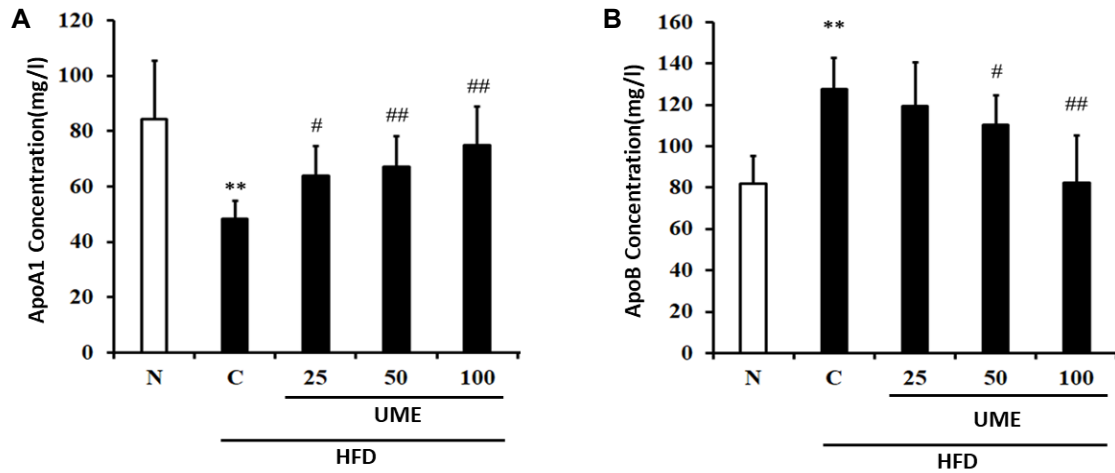


Fig. 1. Lipid biomarkers in serum of UME-treated HFD-fed rats. (A-B) Serum concentrations of apolipoprotein A1 (ApoA1) and apolipoprotein B (ApoB) were measured by a commercial analysis kit. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=10). ** $p < 0.01$, compared to normal. # $p < 0.05$, compared to the control. ## $p < 0.01$, compared to the control. N; normal, C; high-fat diet (HFD), UME 25-100; HFD + UM (25, 50, 100 mg/kg)

화를 확인하였다. 지질대사에 있어서 조직특이성을 가지는 PPAR 단백질의 활성화는 매우 중요한 역할을 담당하고 있는데 본 연구에서는 주로 간과 조직에서 아포지단백의 합성과 지방산의 산화를 활성화시키는 PPAR- α 와 지방조직에서 특이적으로 지방조직의 분화를 촉진시킴으로써 지방세포내 TG 합성과 지방축적을 증가시키는 PPAR- γ [1]의 수준 변화를 확인하였다. N 군의 측정치를 100%로 하였을 때, HFD 섭취를 통해 PPAR- α 의 발현은 $61.27 \pm 9.30\%$ 로 약 39% 감소하였고,

UME25, UME50, UME100 군에서 각각 $68.54 \pm 8.74\%$, $83.77 \pm 3.20\%$, $99.96 \pm 4.93\%$ 로 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였다. 이는 본 연구 조건하에서는 지질의 산화 작용이 정상수준까지 회복되었을 것이라 사료된다(Fig. 2A). 본 연구에서는 말초조직에서 특이적으로 지질산화(지방산 β 산화)를 촉진시키는 PPAR- β 또는 PPAR- δ [1]에 대한 발현수준 변화까지는 조사하지 않았지만 본 연구결과에서 확인되는 간에서의 PPAR- α 수준증가와 혈중 HDL-C 수준의 증가 그리고 간과 혈액의 TG

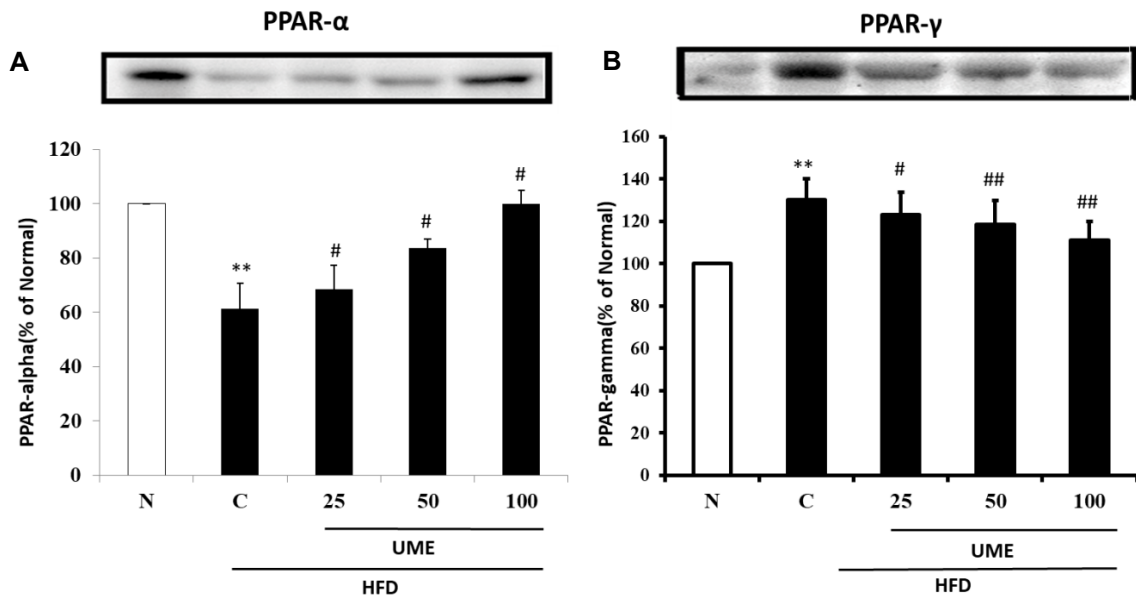


Fig. 2. Expression of PPAR- α (A) and PPAR- γ (B) in the liver of UME-treated HFD-fed rats. The protein expression levels of PPAR-alpha and PPAR-gamma in the liver tissue were measured by Western blot. The bar graph indicates the average PPAR-alpha and PPAR-gamma expression compared to normal group. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=10). ** $p < 0.01$, compared to normal. # $p < 0.05$, compared to the control. ## $p < 0.01$, compared to the control. N; normal, C; high-fat diet (HFD), UME 25-100; HFD + UME (25, 50, 100 mg/kg)

수준의 감소 등을 연계하여 볼 때 UME는 PPAR 단백질들의 조절을 통해 지방산 산화를 촉진시키는 기전에 관여하고 있음을 충분히 알 수 있다. PPAR- α 의 증가와 연계하여 지방조직의 PPAR- γ 의 발현 역시 UME에 의해 감소되는 것이 확인되었다. N 군의 측정치를 100%로 하였을 때, HFD 군의 PPAR- γ 는 130.08 \pm 9.92%로 발현이 증가하였고, UME25, UME50, UME 100 군에서 각각 123.12 \pm 10.67%, 118.67 \pm 11.14%, 111.07 \pm 9.01%로 농도 의존적으로 발현이 감소되었다(Fig. 2B). 이는 본 연구팀에서 이전에 보고한 *in vitro*와 *in vivo* 연구 결과에서 UME가 간에서의 지방축적을 저해하는 효과를 가진다[8, 11]는 내용을 추가적으로 검증할 수 있는 결과이다. 때문에, UME는 지방축적 저해와 함께 지방산화 촉진작용에 의해 간과 혈중의 지질 수준이 개선되는 효과를 가지고 있는 것으로 사료되며 본 연구 모델에서처럼 고지방 섭취의 경우에는 지방축적 저해 효과보다는 지방산 산화를 가속화시켜 체내 지질 수준에 대한 항상성 유지를 할 수 있도록 작용하는 것으로 보여진다. 추가적으로, 지방산 합성과정의 유전자발현을 촉진시키는 SREBP 단백질 중 TG 합성과 관련된 SREBP1은 본 연구팀의 사전 보고에서 UME에 의해 거의 정상수준으로 감소되는 것을 확인하여 TG 합성 감소 효과가 있음을 제안하였고[11], 본 연구에서는 콜레스테롤과 지질 결합/수송 단백질의 합성과

관련된 SREBP2 단백질의 수준변화를 확인하였다. N 군의 값을 100%로 보았을 때, HFD 군에서는 185.75 \pm 2.92%로 발현량이 증가하였고, UME25, UME50, UME100 군에서는 167.48 \pm 14.00%, 143.47 \pm 4.18%, 136.81 \pm 9.72%로 HFD 군에 비해 90%, 77%, 74% 수준으로 감소된 것을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과를 볼 때, 본 연구팀에서 보고하였던 UME 처리에 따른 SREBP1 단백질 수준의 감소가 UME 50 mg/kg과 100 mg/kg 처리 시 N 군에서의 수준과 거의 동일하였던 것[8]과는 달리 UME에 의한 SREBP2와 연계된 지질(콜레스테롤) 합성의 저해 효과는 크지 않은 것으로 사료된다. 하지만 앞에서 언급하였듯, UME 처리에 의해 간과 혈청 콜레스테롤의 감소 수준이 중성 지질의 그것과 비슷하거나 큰 것으로 보아 PPAR- γ 의 감소로 인하여 지방세포 분화와 지질축적의 제한이 유도되는 것과 함께 HDL-C 수준의 증가와 연관되어 잉여 콜레스테롤의 체외 배출이 활성화된 것으로 사료된다. 이상의 결과들을 종합해보면 UME는 간과 조직에서의 AMPK 활성화를 통해 하위 작용기전 내 지질합성 조절에 기인하는 SREBP 단백질과 지방축적 및 지방산화 조절에 관여하는 PPAR 단백질의 조절을 통해 혈중지질 수준 개선 뿐만 아니라 체내 지방대사 개선에도 기여하는 것으로 확인되며 특히 지방산의 산화 작용을 촉진시키는 역할이 더 큰 것으로 사료된다. 따라서, UME는 혈중 지질개선에 도움이 되는 기능성식품의 개발 가능성을 가지고 있을 것이라 사료되며 본 연구를 기초로 하여 향후 관련 표적 효과에 대한 의약품 개발도 기대할 수 있을 것이라 보여진다.

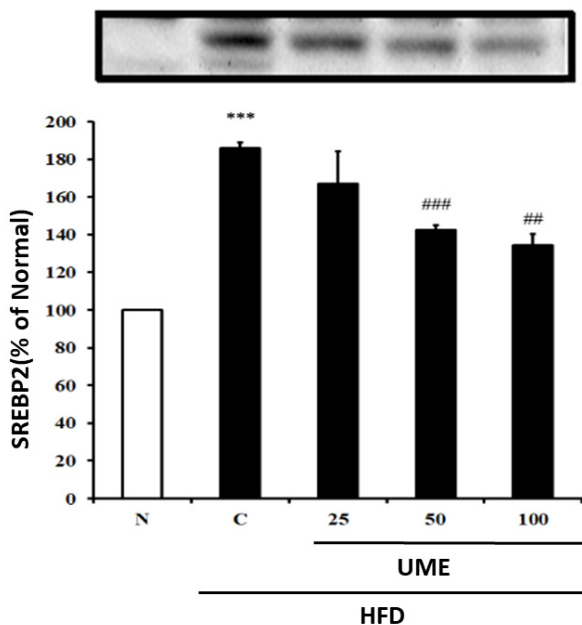


Fig. 3. Expression of SREBP2 in the liver of UME-treated HFD-fed rats. The protein expression levels of SREBP2 in the liver tissue were measured by Western blot. The bar graph indicates the average SREBP2 expression compared to normal. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=10). *** $p < 0.001$, compared to normal. ## $p < 0.01$, compared to the control. ### $p < 0.001$, compared to the control. N; normal, C; high-fat diet (HFD), UME 25-100; HFD + UME (25, 50, 100 mg/kg)

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역 특화산업육성사업(R&D, P0002747)”으로 수행된 연구 결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahmed, W., Ziouzenkova, O., Brown, J., Devchand, P., Francis, S., Kadakia, M., Kanda, T., Orasanu, G., Sharlach, M., Zandbergen, F. and Plutzky, J. 2007. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J. Intern. Med.* **262**, 184-198.
- Atkinson, L. L., Kozak, R., Kelly, S. E., Onay, B. A., Russell, J. C. and Lopaschuk, G. D. 2003. Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, 923-930.
- Choudhary, M. I., Naheed, S., Jalil, S., Alam, J. M. and

- Attaur, R. 2005. Effects of ethanolic extract of *iris germanica* on lipid profile of rats fed on a high-fat diet. *J. Ethnopharmacol.* **98**, 217-220.
4. Emiel, P. C. van der Vorst. 2020. High-density lipoproteins and apolipoprotein A1. *Subcell. Biochem.* **94**, 399-420.
 5. Folch, J., Lee, S. M. and Sloanestainley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
 6. Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499-502.
 7. Guo, P., Kai, Q., Gao, J., Lian, Z. Q., Wu, C. M., Wu, C. A. and Zhu, H. B. 2010. Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of amp-activated protein kinase. *J. Pharmacol. Sci.* **113**, 395-403.
 8. Han, H. J., Song, X., Yadav, D., Hwang, M. S., Lee, J. H., Lee, C. H., Kim, T. H. and Kwon, J. 2019. *Ulmus macrocarpa Hance* modulates lipid metabolism in hyperlipidemia via activation of AMPK pathway. *PLOS One* **14**, e0217112.
 9. Jeong, K. Y. and Kim, M. L. 2012. Physiological activities of *Ulmus davidiana* L. extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 104-109.
 10. Kim, K. B., Jo, B. S., Park, H. J., Park, K. T., An, B. J., Ahn, D. H., Kim, M. U., Chae, J. W. and Cho, Y. J. 2012. Healthy functional food properties of phenolic compounds isolated from *Ulmus pumila*. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 909-918.
 11. Kim, T. H., Lee, J. J., Kwon, J. K. and Lee, C. H. 2019. Effects of *Ulmus macrocarpa Hance* water extract on lipid metabolism in HepG2 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 1186-1194.
 12. Knight, B. L., Hebbachi, A., Hauton, D., Brown, A. M., Wiggins, D., Patel, D. D. and Gibbons, G. F. 2005. A role for PPAR alpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* **389**, 413-421.
 13. Lee, I., Kwon, D. H., Lee, S. H., Lee, S. D., Kim, D. W., Lee, J. H., Hyun, S. K., Kang, K. H., Kim, C. M., Kim, B. W., Hwang, H. J. and Chung, K. T. 2014. Immune-modulation effect of *Ulmus macrocarpa Hance* water extract on Balb/c mice. *J. Life Sci.* **24**, 1151-1156.
 14. Morita, S. Y. 2016. Metabolism and modification of apolipoprotein B-containing lipoproteins involved in dyslipidemia and atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1-24.
 15. Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B. and Dumon, H. 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **92**, 272-283.
 16. Okerson, T., Patel, J., DiMario, S., Burton, T., Seare, J. and Harrison, D. J. 2017. Effect of 2013 ACC/AHA blood cholesterol guidelines on statin treatment patterns and low-density lipoprotein cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease patients. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e004909.
 17. Rho, J., Seo, C. S., Park, H. S., Wijerathne, C. U., Jeong, H. Y., Moon, O. S., Seo, Y. W., Son, H. Y., Won, Y. S. and Kwun, H. J. 2019. *Ulmus macrocarpa Hance* improves benign prostatic hyperplasia by regulating prostatic cell apoptosis. *J. Ethnopharmacol.* **233**, 115-122.
 18. Thomson, D. M. and Winder, W. W. 2009. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *ACTA Physiologica* **196**, 147-154.
 19. Uddin, M. J., Joe, Y., Zheng, M., Kim, S., Lee, H., Kwon, T. O. and Chung, H. T. 2012. Inhibitory effects of *chung hun wha dam tang* (CHWDT) on high-fat diet-induced obesity via AMP-activated protein kinase activation. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, e652473.
 20. Wang, N., Kong, R., Luo, H., Xu, X. and Lu, J. 2017. Peroxisome proliferator-activated receptors associated with non-alcoholic fatty liver disease. *PPAR Res.* **2017**, 6561701.
 21. Watts, G. F. and Karpe, F. 2011. Triglycerides and atherogenic dyslipidaemia: extending treatment beyond statins in the high-risk cardiovascular patient. *Heart* **97**, 350-356.
 22. Xiao, C., Dash, S., Morgantini, C., Hegele, R. A. and Lewis, G. F. 2016. Pharmacological targeting of the atherogenic dyslipidemia complex: the next frontier in CVD prevention beyond lowering LDL cholesterol. *Diabetes* **65**, 1767-1778.
 23. Yang, H., Hwang, I., Kim, S., Hong, E. J. and Jeung, E. B. 2013. *Lentinus edodes* promotes fat removal in hypercholesterolemic mice. *Exp. Ther. Med.* **6**, 1409-1413.
 24. Zhou, L., Li, C., Gao, L. and Wang, A. 2015. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Mol. Med. Rep.* **12**, 4015-4021.

초록 : 왕느릅나무 추출물에 의한 설치류 혈중지질 개선 효과에 대한 연구황미선¹ · 김태희² · 이정준² · 권중기³ · 이진영^{4*}(¹경성대학교 공과대학 제약공학과, ²(주)네이처텍, ³전북대학교 수의과대학 수의학과, ⁴경성대학교 약학대학 약학과)

이전 연구에서 *Ulmus macrocarpa Hance*의 열수추출물(UME)이 고지질혈증 상태에서 지질대사를 향상시켰으며, AMPK 경로를 통한 지질합성 억제에 관해 제안된 바 있다. 이 연구의 목표는 UME가 혈청 지질 수치를 어떻게 조절할 수 있었는지에 대한 가능성을 확장하기 위해 간과 말초 조직 사이의 관련 지질 대사를 밝히기 위한 것이다. 고지질혈증 유발 설치류에서 6주 동안 UME를 경구 투여한 후 혈청 중 트리글리세라이드(TG)와 총콜레스테롤(TC) 수치가 감소했고, 혈청 HDL콜레스테롤 수치는 증가했다. 간 분석에서도 UME 처리시 대조군에 비해 TG와 TC 함량은 감소하였다. 단, UME에 의한 AMPK 경로 조절은 간의 지방생성 억제를 통해 고지질혈증 상태를 부분적으로 개선하였다. 실제로, UME에 의한 간지질 함량 감소는 훨씬 적은 반면, 아포리포프로틴 B (apoB)와 아포리포프로틴 A (apoA)의 혈청 농도는 UME 투여에 의해 정상 그룹 정도의 수치로 돌아왔다. 이것은 간지방생성의 억제만으로 일어날 수 있는 현상은 아니라고 판단하였다. 따라서, UME 투여의 효과는 지질산화의 개시 자극과 간 지질합성의 억제 모두를 통해 혈청 지질 수치를 조절함으로써 혈액 순환을 향상시킬 수 있을 것이다.